

RELACIÓN ENTRE LA DEPRESIÓN Y LA PERIODONTITIS

ESTUDIO EXPERIMENTAL *IN VIVO* EN RATAS WISTAR

- RESULTADOS PRELIMINARES -



EDUARDO ALCALDE DEIRO

TUTORA: DRA. BERTA LEGIDO ARCE

TRABAJO FIN DE MÁSTER EN CIENCIAS ODONTOLÓGICAS

DPTO. DE ESPECIALIDADES CLÍNICAS ODONTOLÓGICAS

UNIVERSIDAD COMPLUTENSE DE MADRID

ÍNDICE

1. INTRODUCCIÓN	3
2. HIPÓTESIS	10
3. OBJETIVOS	10
4. MATERIAL Y MÉTODOS	11
5. RESULTADOS	20
6. DISCUSIÓN	23
7. CONCLUSIONES	25
8. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS	26

1. INTRODUCCIÓN

1.1. *Enfermedades periodontales: clasificación, etiopatogenia y tratamiento*

Definimos las enfermedades periodontales como aquellas que afectan a los tejidos de revestimiento y soporte del diente (encía, hueso, cemento radicular y ligamento periodontal), a través una respuesta inflamatoria de origen infeccioso (provocado por la alteración en el equilibrio existente entre los patógenos subgingivales y las defensas del hospedador) (Sanz y van Winkelhoff 2011). Esta respuesta puede circunscribirse únicamente a la encía (encontrándonos ante un cuadro de **gingivitis**, de carácter reversible), o afectar también al periodonto de soporte provocando la progresiva pérdida del mismo (en cuyo caso estaríamos ante un cuadro de **periodontitis**, de carácter irreversible).

Durante los últimos 19 años estas enfermedades se han clasificado siguiendo las directrices establecidas por el *Workshop* Internacional de 1999, que las dividió en 8 grupos. De esta manera, en lo que atañe a la periodontitis, podíamos distinguir 5 presentaciones diferentes: periodontitis crónica, periodontitis agresiva, periodontitis como manifestación de enfermedades sistémicas, enfermedades periodontales necrosantes y abscesos periodontales. (Armitage 1999)

Sin embargo, en 2017 se celebra un nuevo *Workshop* Internacional con motivo del desarrollo de una **clasificación** que supla las carencias de su predecesora, y se adapte mejor a la evidencia científica surgida a lo largo de su periodo de vigencia. De esta manera, se introducen cambios notables en la clasificación de la periodontitis, que ya no distingue entre crónica y agresiva, sino que pasa a verse influida por tres descriptores (manteniendo la distinción de las necrosantes y las asociadas a enfermedades sistémicas) (Papapanou et al. 2018; Caton et al. 2018):

- **Estadío:** de I a IV, basado en la gravedad y en la complejidad del manejo clínico.
- **Extensión y distribución:** localizada/generalizada, distribución incisivo-molar

- **Grado:** A, B o C, en función de la evidencia o riesgo de rápida progresión.

En lo que a su **etiopatogenia** se refiere, la periodontitis es una enfermedad que se origina de forma primaria por la presencia de bacterias patógenas subgingivales que se organizan formando biofilms, aunque su etiología global es multifactorial. Al ser las bacterias las desencadenantes originales de la patología, conocer el papel específico que desempeñan es de vital importancia para poder establecer pautas de tratamiento adecuadas. Es por ello que Socransky agrupa en 1998 a las bacterias orales en 5 grupos o *clusters* (según la probabilidad de encontrarlas formando biofilms entre sí), de tal manera que identifica al **cluster rojo** (*Tannerella forsythia*, *Porphyromonas gingivalis*, *Treponema denticola*) y al **cluster naranja** (*Fusobacterium nucleatum*, *Prevotella intermedia* y *Prevotella nigrescens*, *Peptoestreptococcus micros*, *Campylobacter rectus* y *showae*, *Campylobacter gracilis*, *Eubacterium nodatum* y *Streptococcus constellatus*) como los que guardan mayor relación con los parámetros clínicos más significativos en pacientes con periodontitis. (Socransky 1998) Previamente, en el Workshop internacional de Periodoncia de 1996, estos patógenos ya se clasificaron en función de su grado de asociación con la enfermedad, determinando que existían bacterias con una **asociación fuerte** (*Aggregatibacter actinomycetemcomitans*, *Porphyromonas gingivalis* y *Tannerella forsythia*), con **asociación moderada** (*Prevotella intermedia*, *Fusobacterium nucleatum*, *Treponema denticola*, etc.), y otras con una **asociación débil**.

Aunque, como ya se ha dicho, el agente etiológico primario sea de origen bacteriano, su mera presencia no implica que vaya a producirse el desarrollo de la enfermedad en el huésped. Sabemos que esto es así porque, en primer lugar, se han aislado bacterias periodontopatógenas (*Aggregatibacter actinomycetemcomitans*, *Porphyromonas gingivalis* y *Prevotella intermedia*) en individuos que no han manifestado ningún tipo de progresión de la enfermedad (Cullinan 2003). Además, la **susceptibilidad** del individuo frente a la acción de estas bacterias juega un papel fundamental, algo que ya introdujeron algunos autores al hablar de la genética como factor implicado en la patogénesis de la periodontitis (Page y Kornman 1997) o, más recientemente, al asociar las alteraciones en la homeostasis entre las bacterias y el huésped (o **disbiosis**) con inmunodeficiencias, enfermedades sistémicas, factores

ambientales o modificaciones epigenéticas propias de cada individuo (Hajishengallis 2014).

Dicho esto, sabemos, pues, que la presencia de bacterias periodontopatógenas en individuos susceptibles va a desencadenar una **respuesta inflamatoria** mediada por la liberación bacteriana de aminas y citoquinas que contribuyen a aumentar la permeabilidad vascular, así como a promover la migración de neutrófilos polimorfonucleares (PMN) en la lesión inicial. Estos PMN, a su vez, liberarán nuevas citoquinas dando lugar a una cascada de mediadores inflamatorios que, en última instancia, promoverán la **destrucción** de hueso y tejido conectivo. Esta respuesta inflamatoria del hospedador variará en función de diversos factores citados anteriormente: genética, enfermedades sistémicas (como la diabetes), factores ambientales (como el tabaco), etc. (Kornman 2008; Hajishengallis 2014).

Por último, y en lo que respecta al **tratamiento** de estas enfermedades, hace décadas que sabemos que en la mayor parte de los casos el raspado y alisado radicular (RAR) en combinación con adecuadas instrucciones de higiene oral consigue controlar la progresión de la enfermedad de forma correcta (previa fase de control sistémico si fuese necesaria) con numerosas publicaciones que así lo demostraron (Ramfjord et al. 1973; Ramfjord et al. 1975; Knowles et al. 1979; Badersten et al. 1981). El uso de antisépticos coadyuvantes al RAR (clorhexidina) también ha demostrado ser de gran utilidad en el control microbiológico durante e inmediatamente después del tratamiento (Addy 1986; Quirynen et al. 2005). Además, dado el carácter infeccioso de la periodontitis, se ha visto que el uso de antimicrobianos sistémicos (**antibióticos**) asociados al RAR podría proporcionar mayores beneficios que el empleo único de RAR, sobre todo en pacientes con bolsas profundas, periodontitis “activa” (en progresión) o con un perfil microbiológico concreto (Herrera et al. 2002; Herrera et al. 2008). La investigación reciente se ha centrado fundamentalmente en la utilización de amoxicilina+metronidazol, ciprofloxacino+metronidazol, metronidazol solo y azitromicina. Este último parece ser menos efectivo en general, pero mejor en términos de cumplimiento por parte del paciente (por tener que tomarse 1 vez al día durante solo 3 días), y con menos efectos adversos. (Graziani et al. 2017).

1.2. Medicina periodontal. Mecanismos de interacción.

Este término fue introducido por primera vez en el Workshop Mundial de Periodoncia de 1996 por Steven Offenbacher, definiéndolo como una disciplina que se centra en la evaluación de las relaciones entre las enfermedades sistémicas y periodontales, y su plausibilidad biológica en grupos humanos y modelos animales. (Sanz y Herrera 2001). De esta forma, se han planteado dos posibles mecanismos de interacción entre ambas patologías:

1.2.1. Bacteriemia

Este concepto hace referencia al paso de bacterias a la sangre procedentes de biofilms orales, lo que podría suceder al romperse la barrera epitelial ulcerada de la bolsa periodontal, poniendo en contacto el tejido conectivo y la microbiota de la bolsa. Al introducirse en el torrente sanguíneo, las bacterias pueden llegar a otras localizaciones del organismo, causar infecciones a distancia y desencadenar respuestas inflamatorias que podrían generar complicaciones cardiovasculares, a nivel placentario, etc. (Papapanou 2015). La evidencia disponible demuestra que esta invasión bacteriana puede producirse tras realizarse el tratamiento periodontal (Kinane et al. 2005), o incluso tras el cepillado (Lockhart et al. 2008) y el uso de la seda dental (Crasta et al. 2009).

1.2.2. Inflamación sistémica

Frente a la infección bacteriana y a sus correspondientes factores de virulencia, los leucocitos, células endoteliales y hepatocitos responden secretando mediadores proinflamatorios (citoquinas, proteína C reactiva o PCR, etc.). Ante la exposición continuada a los antígenos, estos reaccionarán con anticuerpos circulantes específicos que sostendrán y amplificarán la inflamación en las localizaciones en que se depositen. (Van Dyke y Van Winkelhoff 2016); de entre todos los mediadores inflamatorios que intervienen en este proceso, cabe destacar la PCR como la molécula plasmática que

constituye uno de los predictores de accidentes cardiovasculares con mayor evidencia científica (Ridker et al. 1997).

Es interesante remarcar también que el tratamiento periodontal ejerce un efecto positivo en la reducción de la inflamación tanto local como sistémica, lo que ha sido demostrado en varios estudios realizados sobre pacientes con diversas patologías: síndrome metabólico (Torumtay et al. 2015), cardiovascular (Cala et al. 2014), diabetes (Correa et al. 2010)

1.3. *Relación entre la periodontitis y la depresión*

1.3.1. Depresión

La **depresión** es un trastorno del comportamiento que, si bien a menudo no es correctamente diagnosticado, consiste en un síndrome que afecta a todos los grupos de edad y que impide que los individuos tengan reacciones normales ante las dificultades de la vida, debido a que implica alteraciones en la regulación emocional, cognitiva, comportamental y somática. Se relaciona con diversas alteraciones orales, entre las que se encuentran los trastornos de ATM, el liquen plano oral, el síndrome de boca ardiente o las enfermedades periodontales (que serán nuestro objeto de interés en este caso). (Ababneh et al. 2010)

No podemos hablar de depresión sin hablar también de **estrés crónico**, ya que son dos situaciones estrechamente relacionadas que interactúan constantemente, y ambas tienen efectos sobre el organismo. Es necesario entender que el estrés tiene la capacidad de influir en la respuesta inmune del hospedador, produciendo un estado de **inflamación crónica** a través de una serie de mecanismos complejos y bidireccionales (el estrés puede producir inflamación, tanto como la inflamación puede producir estrés). La evidencia, proporcionada por estudios tanto en animales como en humanos, nos dice que el estrés es capaz de afectar al sistema inmune de múltiples formas; actúa a nivel de la producción de glucocorticoides y catecolaminas, lo que implica la capacidad de inducir **inmunosupresión**. (Warren et al. 2014)

Por otro lado, la relación entre el estrés y la depresión también es compleja y bidireccional: el estrés crónico puede derivar en depresión (en individuos susceptibles), y la depresión a su vez puede agravar el estrés. Se ha visto que en individuos con depresión clínica los niveles de **PCR, interleuquina-1 (IL-1) e interleuquina-6 (IL-6)** se encontraban fuertemente relacionados con el cuadro depresivo, e incluso que ese cuadro podía ser un predictor de los niveles de PCR e IL-6 en pacientes cardiopatas y oncológicos. Asimismo, se ha evidenciado que el **tratamiento antidepressivo** con inhibidores de la recaptación de la serotonina reducía los niveles séricos de IL-1 e IL-6 (Warren et al. 2014).

1.3.2. Plausibilidad biológica

Ya en 1998 Genco et al. formularon una hipotética relación entre el estrés y la periodontitis a través de la acción inmunodepresiva del primero (Genco et al. 1998), lo que indirectamente sería aplicable a pacientes con depresión por la relación anteriormente mencionada. Actualmente, la plausibilidad biológica de la relación entre periodontitis y depresión se fundamenta en los estudios que muestran cómo la depresión puede afectar a la respuesta inmune y, con ello, a la susceptibilidad individual frente a la acción de las bacterias periodontopatógenas; así, la revisión sistemática de Perruzo et al. de 2007 concluyó que, a pesar de las diferencias metodológicas entre los estudios analizados, la mayor parte de los mismos mostraron una relación positiva entre el estrés y la periodontitis (Perruzo et al. 2007).

En pacientes con depresión (y, por ende, bajo estrés) aumentan los niveles de glucocorticoides y catecolaminas circulantes; los **glucocorticoides** liberados en la corteza suprarrenal inducen, en la mayoría de las ocasiones, una reducción en la secreción de citoquinas proinflamatorias, mientras que las **catecolaminas** estimulan la acción de las prostaglandinas y de las enzimas proteolíticas (que indirectamente pueden provocar destrucción tisular). (Araújo et al. 2016)

Sin embargo, no hay que olvidar que estas dos patologías pueden interactuar también bajo mecanismos derivados de los **cambios comportamentales** que sufren los

pacientes con depresión (asociados a una mala higiene oral, el consumo de tabaco y/o alcohol, etc.) (Genco et al. 1998)

1.3.3. Evidencia científica disponible

No hay una extensa literatura que analice la relación entre la periodontitis y la depresión. Sin embargo, en 2016 Araújo et al. realizaron una revisión sistemática de los estudios publicados hasta el momento, en la que incluyeron un total de **15 artículos**: 8 estudios transversales, 6 estudios de casos-controles y 1 estudio de cohortes. De todos ellos, **6 refirieron una asociación positiva** entre la depresión y los parámetros clínicos de la periodontitis (4 de ellos transversales, y los otros 2 de casos-controles); **9 estudios no mostraron asociación** entre ambas patologías (5 transversales, 3 casos-controles y 1 de cohortes), aunque cabe destacar que uno de los estudios transversales sí encontró diferencias en los índices de placa y gingivales (pero no así en el resto de variables evaluadas). Concluyeron, por tanto, que existía una **gran heterogeneidad** entre los estudios (posiblemente influenciado por la gran variabilidad metodológica entre estudios). (Araújo et al. 2016)

1.4. *Justificación*

Basándonos en la plausibilidad biológica, y aunque la evidencia científica arroje resultados contradictorios y sea necesaria una mayor estandarización metodológica, sabemos que la **depresión** es una enfermedad que coexiste con un estado de **estrés crónico**, alterando la respuesta inmune del hospedador y aumentando con ello su susceptibilidad frente al desarrollo de otras patologías (entre las que podría encontrarse la **periodontitis**). Todo ello genera además un estado de inflamación crónica que podría implicar indirectamente la aparición de accidentes cardiovasculares, complicaciones en el embarazo, etc. Es necesario encontrar evidencias más sólidas de la relación entre la periodontitis y la depresión a fin de dilucidar hasta qué punto el control periodontal podría ayudarnos a prevenir las complicaciones mencionadas, siendo éste el **primer estudio experimental in vivo** diseñado para estudiar la relación entre ambas patologías.

2. HIPÓTESIS

Existe una relación entre el carácter inflamatorio del estrés crónico presente en los pacientes depresivos y la periodontitis.

3. OBJETIVOS

3.1. **Objetivo general:**

Analizar mediante un estudio preclínico *in vivo* los mecanismos de la relación entre ciertas enfermedades psiquiátricas (depresión) y periodontales (periodontitis).

3.2. **Objetivos específicos:**

- 1.- Poner a punto un modelo preclínico *in vivo* (ratas) para el estudio de la influencia de las enfermedades periodontales (periodontitis) en las enfermedades psiquiátricas (depresión) tanto a nivel molecular como comportamental.
- 2.- Caracterizar la vía de señalización TLR-4 a nivel periférico (plasma y células mononucleares de sangre periférica (PBMCs) y del sistema nervioso central en los diferentes grupos de estudio.
- 3.-Caracterizar las alteraciones comportamentales producidas por la activación del sistema inmune innato/neuroinflamación en los diferentes grupos a estudio.
- 4.- Poner a punto la metodología específica para el análisis de *P. gingivalis* en tejido cerebral fresco de rata.
- 5.- Comparar la cantidad y presencia de *P. gingivalis* en tejido cerebral fresco de ratas en los diferentes grupos

4. MATERIAL Y MÉTODOS

4.1. Consideraciones éticas

Todos los protocolos experimentales, manejo de animales y sacrificio se realizaron siguiendo las normas de uso de animales de experimentación establecidas por la legislación vigente (según RD 53/2013), previa aprobación por el Comité de Ética en Experimentación Animal de la UCM. Las ratas fueron estabuladas en las instalaciones (CAI animalario de la Facultad de Medicina) de la UCM. Se utilizaron ratas Wistar: Hann macho peso comprendido entre 230-250grs.

4.2. Diseño de estudio

Nuestro diseño experimental pretende determinar si los animales con periodontitis inducida presentan una mayor vulnerabilidad frente a la respuesta neuroinflamatoria y los cambios comportamentales producidos en un modelo experimental de depresión basado en la exposición a estrés. Para ello el estudio constará de dos fases de investigación, tal y como se representa a continuación:

- *Fase 1:* Inducción del modelo de periodontitis (12 semanas).
- *Fase 2:* Inducción del modelo de depresión (3 semanas).

Durante todo el periodo de inducción de la depresión se continuará con el proceso de lavados orales con patógenos periodontales con el fin de mantener el estímulo infeccioso.

Al final de este periodo, existirán 4 grupos de estudio: (a) con periodontitis y con depresión (b) con periodontitis y sin depresión, (c) sin periodontitis y con depresión y (d) sin periodontitis y sin depresión.

5.3. Modelos de enfermedades

a. Modelo de periodontitis:

Para inducir periodontitis experimental en las ratas del estudio se preparó una disolución de dos bacterias con demostrada patogenicidad periodontal; *Porphyromonas gingivalis* ATCC W83K1 y *Fusobacterium nucleatum* DMSZ 20482. Ello conlleva el mantenimiento de los cultivos anaerobios bacterianos (80% N₂, 10% H₂, 10% CO₂ at 37°C) y la preparación de la disolución diaria con la concentración adecuada de bacterias. Las bacterias se cultivaron en medio de cultivo Brain Heart Infusion (BHI) (25ml) (Becton, Dickinson and Company, USA). El crecimiento bacteriano se ajustó por espectrofotometría con el objetivo de obtener una solución de BHI con 10⁹ unidades formadoras de colonias (UFC/ml) para cada una de las bacterias. Se retiró con ayuda una pipeta 100ul de cada uno de los cultivos y se sembrarán las diluciones 10⁻⁶, 10⁻⁷ y 10⁻⁸ con el fin de controlar las UFC/ml del cultivo y la ausencia de contaminaciones. Los dos cultivos puros se mezclaron y centrifugaron durante 10 minutos a 4000rpm con el fin de separar las bacterias del medio de cultivo. Una vez retirado el medio de cultivo, las bacterias depositadas se volvieron a suspender en 50ml de la solución de lavado [PBS (phosphate-buffered saline) al 2% de carboximetilcelulosa (CMC) (Sigma, St. Louis, MO, USA)]. Se preparó asimismo una disolución de lavado sin bacterias para utilizarla como placebo. Se administró 1ml de la disolución con las bacterias o placebo cuatro veces por semana durante doce semanas a cada uno de los animales de estudio con ayuda de una jeringuilla de insulina.

b. Modelo de depresión (Chronic Mild Stress [CMS]) (Martín-Hernández y cols, 2016)

Los animales fueron sometidos durante 21 días a una serie aleatoria de estímulos estresantes de intensidad leve, para evitar la habituación. En un mismo día los animales estuvieron expuestos a dos tipos de estímulos estresantes distintos y consecutivos, salvo un día a la semana en el que no estuvieron en presencia de ningún estímulo estresante. Estos estímulos, por tanto, se produjeron en periodos de 12 horas, de 8 a 20h, dos días a la semana cada uno.

Los estímulos estresantes empleados fueron:

- 1) Emparejar dos animales en la misma jaula. Un mismo animal tendrá que ser visitante y visitado a lo largo de la semana
- 2) Jaula inclinada en un ángulo de 45°C
- 3) Jaula mojada: 250 ml de agua en el serrín de cada una de las jaulas
- 4) Iluminación Estroboscópica: 150 flashes /min
- 5) Privación Agua
- 6) Privación comida

Se trata pues de un estrés crónico, mixto físico-psicológico, impredecible e inescapable que desde que se utilizó por primera vez (Willner y cols., 1987) se ha considerado uno de los mejores modelos animales de depresión. La elección de este modelo se debe a que su validez aparente, de constructo y predictiva se han demostrado en un gran número de estudios (Willner, 1997).

4.4. Punto final humanitario

El destino final de los animales fue el sacrificio. Éste fue realizado mediante pentobarbital sódico (220mg/kg i.p.; previamente diluido con salino estéril) y posterior decapitación con guillotina.

En el caso en que el animal sufriera lesiones de cualquier tipo, se pusiera enfermo o moribundo, se aplicarán cuidados veterinarios. Si fuera necesario se practicaría la eutanasia por razones humanitarias según recomendaciones y procedimientos autorizados.

Se aplicaron los siguientes criterios de punto final humanitario o de finalización anticipada del estudio o de la eutanasia anticipada del animal. Se utilizará a lo largo de todo el experimento hojas de control del estado de los animales. Para cada uno de los apartados se dará una puntuación:

A. Cambios en el peso corporal

- 0_ Si el peso es normal
- 1_ Pérdida de peso menor del 10 %
- 2_ Pérdida de peso de 10 a 20 %
- 3_ Pérdida de peso mayor del 20 %

B. Apariencia física

- 0_ Normal
- 1_ Falta de acicalamiento
- 2_ Pelaje erizado, descarga nasal y/o ocular
- 3_ Pelaje muy erizado, postura anormal

C. Conducta

- 0_ Normal
- 1_ Cambios menores como cojera
- 2_ Anormal como movilidad reducida o inactivo
- 3_ Vocalizaciones espontáneas, automutilación, inmóvil o hiperactivo

Calificación del punto final: Cuando se alcance una calificación de 3 o más, con base en la lista anterior, se notificará al investigador principal o al Médico Veterinario del proyecto para que tome la decisión de tratar el animal y/o sacarlo del estudio si ese tratamiento interfiere, o indicar la eutanasia del animal. Estos criterios se establecen siguiendo las recomendaciones de Morton D B y cols (2005) y del Ministerio de Ciencia e Innovación.

4.5. Registro de variables clínicas y toma de muestras in vivo:

- *Pruebas de comportamiento y cognición.* Las pruebas comportamentales consistieron en tests para medir el comportamiento depresivo (test de natación forzada) y de anhedonia (splash test) y serán realizadas al final de la última sesión de estrés.
- *Formación del biofilm dental.* Se impregnó el diente seleccionado con un algodón empapado en fucsina básica 2% durante 30s y a continuación se lavó la zona con agua destilada. Se midió el tamaño y profundidad de la zona teñida (Liu y cols. 2012). Para realizar las medidas se tomó una fotografía de la zona y se midió el tamaño utilizando el Software Image Tool3. Fueron realizadas bajo anestesia general al

comienzo del estudio y tras doce semanas de inducción de la periodontitis y tras la última sesión de estrés.

- *Variables clínicas periodontales:* Con una sonda periodontal de 0,4mm de diámetro se registró el índice de sangrado simplificado (presencia/ausencia), la profundidad de sondaje (daño si es >0,2mm) y el índice gingival modificado de Lobene (0-3). Fueron realizadas bajo anestesia general al comienzo del estudio, tras doce semanas de inducción de la periodontitis y tras la última sesión de estrés
- *Toma de muestras subgingival.* Se tomaron muestras subgingivales mediante puntas de papel del número 30 en el primer molar por la cara vestibular durante 30s. Fueron realizadas bajo anestesia general al comienzo del estudio, tras doce semanas de inducción de la periodontitis y tras la última sesión de estrés

4.6. Anestesia y analgesia

Todos los procedimientos de toma de muestras se realizaron bajo anestesia general y condiciones estériles en un animalario utilizando mezcla de Xilacina/Ketamina a una concentración 0,04 ml/100g y 0,08 ml/100g respectivamente.

4.7. Toma de muestras post-mortem

Los animales recibieron una inyección intraperitoneal de anestesia terminal de pentobarbital sódico 320mg/kg. Tras observar la ausencia de movimientos respiratorios y de reflejos al pinzamiento se procedió a la toma de muestras: plasma, células mononucleares de sangre periférica (PBMCs), tejido cerebral fresco o fijado.

- *Obtención de PBMC* a partir de 5 ml de sangre venosa obtenida por punción cardíaca tras proceder a la apertura de la cavidad torácica y anticoagulada con citrato monosódico (3.15%). Se obtuvo también el plasma.
- *Aislamiento y extracción de tejido fresco:* muestras recogidas en nieve carbónica, almacenadas a -80°C hasta posterior utilización según determinación. Se extrajeron las siguientes áreas cerebrales relevantes para el estudio de la neuroinflamación:

como corteza frontal, hipocampo e hipotálamo. Igualmente, se extrajeron muestras de mandíbula, hígado, bazo, ganglios cervicales y corazón.

4.8. Procesado de muestras

4.8.1. Análisis microbiológico

La muestra subgingival será vorteadada durante 2 minutos y el sobrenadante será recogido y transferido a un vial de 1.5 ml estéril. Las muestras serán después centrifugadas a 13000 rpm durante 2 minutos y el pellet resultante será empleado en el proceso de extracción. En el caso de las muestras de tejido cerebral fresco se realizará un procedimiento de lavado y digestión de tejidos cerebrales en un buffer salino (PBS) con proteinasa K, detergente SDS y bajas concentraciones de sales previo a la extracción del DNA. En ambos tipos de muestras se procederá al aislamiento del ADN bacteriano presente en las muestras mediante el kit comercial específico para extracción de ADN bacteriano en muestras humanas. El ADN será congelado a -80°C hasta su posterior análisis. La cuantificación se realizará mediante qPCR a tiempo real empleando tecnología de sondas Taqman

4.8.2. Determinaciones para la caracterización de la vía de señalización TLR-4 a nivel periférico (plasma y células mononucleares de sangre periférica (PBMCs) y del SNC (Receptor TLR-4, co-receptores/moléculas adaptadoras: CD14, MD2, MyD88 y segundos mediadores: TRAM, TRIF, IRAK4, TAK1, MAPKs).

- a.- Origen de la activación TLR-4: Se determinarán en plasma los niveles de LPS (PAMPs), que es ligando endógeno de TLR-4 y de sus proteínas transportadoras como LBP, ApoA1, ApoE y ApoB100 y en PBMCs y tejido cerebral congelado los niveles de los principales activadores DAMPs: HGMB1 y HSP60 -70.
- b.-Consecuencias de activación de la vía de señalización proinflamatoria dependiente de TLR-4:
 - b.1.- Se determinará en muestras periféricas y del SNC la expresión de las citocinas proinflamatorias tipo TNF α , IL1 β y IL-6, quimiocinas tipo MCP-1, MIP y

RANTES, factor nuclear kappaB (NF-κB) y enzimas proinflamatorias dependientes (iNOS, COX-2, m-PGES-1 y su producto Prostaglandina E₂ (PGE₂).

- b.2.- También se analizará el estado de la vía antioxidante dependiente del factor Nrf-2 (Nrf2, PI3K/Akt, GSK-3β, MAPKs (ERK1/2, p38, JNK y f. fosforiladas), Keap-1, enzimas antioxidantes: GSTA-2, NQO-1, HO-1, GPx, GCLM y GCLC) y los niveles de peroxidación lipídica (niveles de los mediadores lipídicos resultantes de la generación de estrés oxidativo MDA y 4-HNE).

Todas las determinaciones propuestas serán realizadas a través de técnicas de biología molecular como RT-PCR, Western Blot y ELISAs específicos.

4.9. Cálculo del tamaño muestral

No existen publicados estudios previos utilizando los dos modelos experimentales combinados que analicen los parámetros bioquímicos planteados en el proyecto. Sin embargo, utilizando datos experimentales previos obtenidos por nuestro grupo con el modelo de CMS y por otros grupos al utilizar protocolos de experimentación similares, podemos fijar una desviación standard hipotética=25 y una diferencia a detectar=40 (1,6 x sigma) en la expresión de parámetros inflamatorios a nivel de proteína y de ARNm (Martín-Hernández y cols., 2016). Lo que nos lleva a proponer un tamaño muestral n=10 animales por grupo, lo que supone un total de 40 ratas tipo Wistar de misma edad y peso.

4.10. Análisis estadístico

Se considerarán todas las variables periodontales clínicas, las microbiológicas (prevalencia y cantidad) y las comportamentales en cada sujeto de estudio en función del grupo de análisis. La distribución de la muestra se comprobará mediante la obtención de los diagramas de caja y de las pruebas de normalidad de Shapiro Wilk. En el caso de las variables cuantitativas, para valorar las diferencias intergrupo se empleará un ANOVA con correcciones de Bonferroni o test de Kruskal-Wallis. En el caso de las comparaciones intragrupo, se empleará test T-Student de muestras relacionadas o test

de U-Mann Whitney. Las variables categóricas se analizarán mediante test de Chi-cuadrado o test de McNemar. Se trabajará con un valor alfa de 0,05 y una potencia de 0,8. Los resultados serán analizados mediante el programa SPSS (v21, IBM).

4.11. Reutilización

En este caso, puesto que el final del experimento incluye la toma de las muestras invasivas y el punto final es la eutanasia, no es posible la reutilización de los animales.

4.12. Severidad

Por duración, intensidad y número de procedimientos y el punto final (eutanasia), el proyecto se engloba dentro de un nivel SEVERO.

4.13. Tipo de proyecto

Tipo II

4.14. Eutanasia

El destino final de los animales será el sacrificio. Éste será realizado mediante sacrificio con pentobarbital sódico (220mg/kg i.p.; previamente diluido con salino estéril) y posterior decapitación con guillotina.

4.15. Capacitación del personal

Todos los responsables del manejo de animales serán biólogos, médicos u odontólogos con capacitación de función C, para el manejo y realización de procedimientos en animales.

4.16. Aplicación de las tres erres

- a) **Reemplazo:** A raíz de la búsqueda bibliográfica en bases de datos relacionadas con Medline (Pubmed, Embase, Cochrane, Scopus), no existen modelos *in vitro*, ni alternativos al empleo de animales que reproduzcan las condiciones de las

enfermedades periodontales y mentales, tanto en su origen (etiopatogenia), como en su resolución (tratamiento). Esto es debido a la complejidad del modelo y su etiología infecto-inflamatoria. Es por ello necesario la utilización de un modelo experimental animal. Animales pequeños como el ratón, la rata, o el conejo, han demostrado ser modelos bien definidos para el estudio de la etiopatogenia de la periodontitis, aportando datos relevantes sobre la interacción entre tejidos blandos y duros durante los procesos inflamatorios. Además, la investigación con animales pequeños es más económica y elimina potencialmente la necesidad de emplear especies más grandes (Stavropoulos et al. 2015, Kantarci et al. 2015). Por último, la rata Wistar permite la determinación de medidas periodontales directas con sonda periodontal y el modelo de inducción de la periodontitis ha sido previamente aprobado (CEA-UCM-50-2014; PROFX184/14). El modelo de depresión en ratas Wistar también ha sido ampliamente validado en la literatura de forma general (Willner et al 1987) y de forma concreta en la Universidad Complutense de Madrid y en la Comunidad Autónoma de Madrid (PRO-EX 419/18)

- b) **Reducción:** En este estudio, se utilizarán 40 animales, 10 ratas por grupo, mínimo número necesario para poder evaluar las diferencias entre los distintos grupos.
- c) **Refinamiento:** Todos los animales serán observados diariamente y su peso analizado semanalmente para detectar cualquier cambio comportamental o fisiológico que pueda indicar sufrimiento. Para garantizar el bienestar de los animales se emplearán a lo largo de todo el proyecto unas hojas de control que permitirán vigilar el estado de dichos animales estableciendo criterios de punto final siguiendo las recomendaciones de Morton D B y cols (2005) y del Ministerio de Ciencia e Innovación.

5. RESULTADOS

Desde abril hasta julio de 2018 (durante 15 semanas) se realizó el experimento (con los exámenes clínicos pertinentes) para la obtención de las variables clínicas periodontales de interés (IP, IG, PS, SS) siguiendo el procedimiento detallado en el punto 4.5 de este documento.

Así, en este trabajo se presentan los resultados preliminares correspondientes a las variables clínicas obtenidas de las 46 ratas que finalizaron el estudio en su estado basal, a las 12 semanas (fin del periodo de inducción de la periodontitis) y a las 15 semanas (fin del periodo de estrés). Las variables microbiológicas no pudieron ser incluidas debido a que todavía no habían sido analizadas por el laboratorio en el momento de redactar este trabajo.

5.1. *Descripción de la muestra*

En el desarrollo del presente estudio se empleó una muestra de 48 ratas Wistar macho de misma edad y peso iniciales, de las cuales 46 finalizaron el periodo de evaluación (cumpliendo con la cifra mínima de 40 sujetos obtenida en el cálculo del tamaño muestral detallado en el punto 4.9).

5.2. *Variables clínicas periodontales*

Las variables clínicas obtenidas del examen periodontal de los sujetos de experimentación se recogen en la Tabla 1.

5.2.1. Índice de Placa (IP)

Según los datos obtenidos, a las 12 semanas se registró un valor de 0 para todos los grupos, y a las 15 semanas se aprecian unos valores disminuidos respecto al estado basal en todos los grupos excepto en el **Grupo 4 (Control)**, el que se ven incrementados ($0,008 \pm 0,026 \rightarrow 0,05 \pm 0,09$).

5.2.2. Índice gingival (IG)

A las 12 semanas se observan incrementos en los valores de todos los grupos,

siendo especialmente relevantes los correspondientes al **Grupo 1 - Periodontitis** ($0,028 \pm 0,041 \rightarrow 0,375 \pm 0,185$) y al **Grupo 2 - Periodontitis + Depresión** ($0,042 \pm 0,056 \rightarrow 0,523 \pm 0,233$). Entre las 12 y las 15 semanas se observa un incremento similar en los mismos grupos, aunque destaca especialmente el que tiene lugar en el **Grupo 3 - Depresión** ($0,063 \pm 0,088 \rightarrow 0,409 \pm 0,219$).

5.2.3. Profundidad de Sondaje (PS)

A las 12 semanas se aprecia un incremento en los valores respecto al estado basal del **Grupo 1 - P** ($0,117 \pm 0,014 \rightarrow 0,263 \pm 0,069$ mm) y del **Grupo 2 - P+D** ($0,124 \pm 0,016 \rightarrow 0,214 \pm 0,043$); los valores entre las 12 y las 15 semanas son similares, salvo por un ligero incremento en el **Grupo 3 - D** ($0,119 \pm 0,018 \rightarrow 0,178 \pm 0,031$).

5.2.4. Sangrado al Sondaje (SS)

A las 12 semanas podemos observar que el mayor incremento en los valores se produce en el **Grupo 1 - P** ($0 \rightarrow 0,067 \pm 0,077$) y el **Grupo 2 - P+D** ($0,007 \pm 0,024 \rightarrow 0,076 \pm 0,102$) de forma similar, manteniéndose el incremento en el **Grupo 1 - P** a las 15 semanas ($0,067 \pm 0,077 \rightarrow 0,098 \pm 0,16$).

5.3. Análisis estadístico

Se realizó la estadística descriptiva de los datos obtenidos durante el periodo de observación. Al haber pocos sujetos por grupo, realizar estadística analítica mediante ANOVA con correcciones de Bonferroni no aportaría resultados representativos, por lo que no consideramos necesario llevarla a cabo.

BASAL				
-------	--	--	--	--

	GRUPO 1 Media (DE)	GRUPO 2 Media (DE)	GRUPO 3 Media (DE)	GRUPO 4 Media (DE)
IP	0,014 (0,032)	0,049 (0,075)	0,021 (0,037)	0,008 (0,026)
IG	0,028 (0,041)	0,042 (0,056)	0,042 (0,066)	0 (0)
PS	0,117 (0,014)	0,124 (0,016)	0,113 (0,008)	0,113 (0,011)
SS	0 (0)	0,007 (0,024)	0,007 (0,024)	0 (0)

12 SEMANAS				
------------	--	--	--	--

	GRUPO 1 Media (DE)	GRUPO 2 Media (DE)	GRUPO 3 Media (DE)	GRUPO 4 Media (DE)
IP	0 (0)	0 (0)	0 (0)	0 (0)
IG	0,375 (0,185)	0,523 (0,233)	0,063 (0,088)	0,192 (0,157)
PS	0,263 (0,069)	0,214 (0,043)	0,119 (0,018)	0,128 (0,031)
SS	0,067 (0,077)	0,076 (0,102)	0 (0)	0 (0)

15 SEMANAS				
------------	--	--	--	--

	GRUPO 1 Media (DE)	GRUPO 2 Media (DE)	GRUPO 3 Media (DE)	GRUPO 4 Media (DE)
IP	0,023 (0,075)	0,023 (0,075)	0 (0)	0,05 (0,09)
IG	0,689 (0,298)	0,727 (0,289)	0,409 (0,219)	0,333 (0,147)
PS	0,289 (0,083)	0,215 (0,047)	0,178 (0,031)	0,147 (0,022)
SS	0,098 (0,16)	0,063 (0,077)	0,038 (0,086)	0,025 (0,056)

Tabla 1. Variables clínicas periodontales

Grupos: 1 (Periodontitis); 2 (Periodontitis – Depresión); 3 (Depresión); 4 (Control)

Variables: IP (Índice de Placa); IG (Índice Gingival); PS (Profundidad de Sondaje); SS (Sangrado al Sondaje)

6. DISCUSIÓN

Este estudio ha sido llevado a cabo con el propósito principal de investigar las posibles relaciones entre la depresión y la periodontitis, así como diseñar y poner a prueba un **modelo preclínico** para el estudio de esta interacción tanto a nivel clínico como microbiológico y comportamental ya que, como hemos mencionado, este es el **primer estudio experimental *in vivo*** que se realiza para estudiar la relación entre las patologías mencionadas. Como ya se reseñó en el apartado 5, los **resultados preliminares** obtenidos hacen referencia a las variables clínicas extraídas de los animales de experimentación. Las variables microbiológicas y comportamentales serán objeto de un análisis posterior cuando estén disponibles.

Así pues, en el **análisis intergrupo** se puede apreciar que, por lo general, los resultados correspondientes a los parámetros clínicos (sobre todo IG y PS) de los grupos 1 (P) y 2 (P+D) son notablemente mayores en comparación a los grupos 3 (D) y 4 (C). Siendo la diferencia fundamental entre ambos pares de grupos la **inducción de la periodontitis**, podríamos deducir que es esta variable la que realmente podría condicionar el incremento de las mediciones entre los grupos y no tanto la inducción de la depresión; esto puede corroborarse al comprobar que no existen grandes diferencias tanto en los parámetros registrados entre los grupos 1 (P) y 2 (P+D), como en los registrados entre los grupos 3 (D) y 4 (C) al cabo de las 15 semanas (tras las 3 semanas de inducción de la depresión). Asimismo, realizar la inducción de la periodontitis mediante lavados podría ser, a priori, más beneficioso en futuros estudios de medicina periodontal como alternativa a las ligaduras (la lesión secundaria a la colocación de las mismas provoca una pérdida ósea más rápida) (Virto et al. 2018), y teniendo en cuenta que en las ratas ya se produce pérdida de inserción en las primeras 9 semanas sin necesidad de inducir la patología periodontal (Bjornsson et al. 2003)

Por otro lado, hay que tener en cuenta que en ratas el sondaje ha de ser realizado bajo magnificación (lo que lo convierte en un registro muy sensible al operador) y que las PS asociadas con pérdida de inserción en ratas se ubican por encima de los 0.5 mm (Bjornsson et al. 2003, Virto et al. 2018), por lo que la sería útil emplear formas

alternativas de medición a la hora de determinar de forma fiable si existe afectación del periodonto (menos sensibles a la técnica y más objetivas (histología, micro-CT, etc.)

Por otro lado, cabe destacar que, en los grupos 2 (P+D) y 3 (D), el IG es la única variable que cuenta con **registros más elevados tras el periodo de inducción de la depresión** con respecto a los valores anteriores (de forma similar a lo referido por Johannsen en 2006) (Johannsen et al. 2006) aunque, curiosamente, no se corresponda con el SS. A pesar de que esto nos podría inducir a especular que el estrés crónico de los pacientes depresivos pueda estar relacionado con un aumento en la inflamación gingival, hay que tener en cuenta que los datos obtenidos por el grupo de Johannsen **no pueden ser comparables estrictamente** con los nuestros debido a la diferente naturaleza de su estudio (de carácter observacional en humanos, mientras que el nuestro es experimental en ratas), y a que el índice gingival empleado es diferente (ellos emplean el IG de Löe y nosotros el IG Modificado de Lobene, ambos condicionados además por la subjetividad del examinador). Asimismo, llama la atención el hecho de haya mediciones nulas en ciertos registros (como en el IP a las 12 semanas en los 4 grupos), lo que podría atribuirse a un error en la toma de datos.

Así pues, podemos resumir que nuestros dos hallazgos principales serían la **validez del modelo** de inducción de la periodontitis, así como una aparente relación entre la depresión y el **aumento del IG**. Sin embargo, en este último punto hemos de puntualizar que, al tratarse de un modelo animal, realmente lo que provocamos en las ratas es un estado de estrés crónico y no una depresión real. Esto es así debido a que la depresión se define como todo un síndrome con multitud de grados, factores etiológicos y consecuencias tanto a nivel psicológico como comportamental que condicionan muchos aspectos de la vida diaria (entre ellos la higiene oral, el tabaquismo y el alcoholismo que influyen en mayor o menor medida en el desarrollo y evolución de las enfermedades periodontales). De hecho, en la literatura encontramos diversas publicaciones que no estudian una relación directa entre la depresión y la periodontitis, sino entre enfermedades psiquiátricas, factores psicosociales, etc... y la periodontitis (dado que la depresión es una entidad difícil de aislar de todos los demás factores) (Moss et al. 1996, Genco et al. 1999, Solis et al. 2004, Ng y Leung 2006, Castro et al. 2006)

6.1. Limitaciones del estudio

- La toma de registros en cada uno de los periodos es sensible a la técnica, al tener que ser realizada bajo magnificación, lo que puede inducir errores subjetivos por parte del examinador
- Las sondas periodontales empleadas para la toma de registros no están adaptadas al periodonto de las ratas, lo que dificulta realizar mediciones de décimas de milímetro.
- Al tratarse de un estudio experimental in vivo, los resultados obtenidos sobre un modelo animal no son totalmente extrapolables a la especie humana.

7. CONCLUSIONES

- Podría deducirse de los resultados una posible relación entre la inducción de la depresión y el aumento de la inflamación gingival, aunque son necesarios más estudios para confirmar esta relación.
- Aunque se necesitan más datos para poder validar este modelo preclínico en su conjunto, en base a los resultados obtenidos podemos decir que la parte correspondiente a la inducción de la periodontitis mediante lavados sí parece ser efectiva.

8. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ABABNEH, K. T., SHAAR, AL, M., & TAANI, D. Q. (2010). Depressive symptoms in relation to periodontal health in a Jordanian sample. *International Journal of Dental Hygiene*, 8(1), 16–21.
- ADDY, M. (1986). Chlorhexidine compared with other locally delivered antimicrobials. A short review. *Journal of Clinical Periodontology*, 13(10), 957–964.
- ALBANDAR, J. M., SUSIN, C., & HUGHES, F. J. (2018). Manifestations of systemic diseases and conditions that affect the periodontal attachment apparatus: Case definitions and diagnostic considerations. *Journal of Periodontology*, 89, S183–S203.
- ARAÚJO, M. M., MARTINS, C. C., COSTA, L. C. M., COTA, L. O. M., FARIA, R. L. A. M., CUNHA, F. A., & COSTA, F. O. (2016). Association between depression and periodontitis: a systematic review and meta-analysis. *Journal of Clinical Periodontology*, 43(3), 216–228.
- ARMITAGE, G. C. (1999). Development of a classification system for periodontal diseases and conditions. *Annals of Periodontology*, 4(1), 1–6.
- BADERSTEN, A., NILVÉUS, R., & EGELBERG, J. (1981). Effect of nonsurgical periodontal therapy. I. Moderately advanced periodontitis. *Journal of Clinical Periodontology*, 8(1), 57–72.
- BJÖRNSSON, M. J., VELSCHOW, S., STOLTZE, K., HAVEMOSE-POULSEN, A., SCHOU, S., & HOLMSTRUP, P. (2003). The influence of diet consistence, drinking water and bedding on periodontal disease in Sprague-Dawley rats. *Journal of Periodontal Research*, 38(6), 543–550.
- CATON, J. G., ARMITAGE, G., BERGLUNDH, T., CHAPPLE, I. L. C., JEPSEN, S., KORNMAN, K. S., ET AL. (2018). A new classification scheme for periodontal and peri-implant diseases and conditions - Introduction and key changes from the 1999 classification. *Journal of Periodontology*, 89(Suppl 1), S1–S8.
- CAÚLA, A. L., LIRA-JUNIOR, R., TINOCO, E. M. B., & FISCHER, R. G. (2014). The effect of periodontal therapy on cardiovascular risk markers: a 6-month randomized clinical trial. *Journal of Clinical Periodontology*, 41(9), 875–882.

- CORREA, F. O. B., GONÇALVES, D., FIGUEREDO, C. M. S., BASTOS, A. S., GUSTAFSSON, A., & ORRICO, S. R. P. (2009). Effect of periodontal treatment on metabolic control, systemic inflammation and cytokines in patients with type 2 diabetes. *Journal of Clinical Periodontology*, 37(1), 53–58.
- CRASTA, K., DALY, C. G., MITCHELL, D., CURTIS, B., STEWART, D., & HEITZ-MAYFIELD, L. J. A. (2009). Bacteraemia due to dental flossing. *Journal of Clinical Periodontology*, 36(4), 323–332.
- CULLINAN, M. P., HAMLET, S. M., WESTERMAN, B., PALMER, J. E., FADDY, M. J., & SEYMOUR, G. J. (2003). Acquisition and loss of *Porphyromonas gingivalis*, *Actinobacillus actinomycetemcomitans* and *Prevotella intermedia* over a 5-year period: effect of a triclosan/copolymer dentifrice. *Journal of Clinical Periodontology*, 30(6), 532–541.
- GENCO, R. J., HO, A. W., GROSSI, S. G., DUNFORD, R. G., & TEDESCO, L. A. (1999). Relationship of stress, distress and inadequate coping behaviors to periodontal disease. *Journal of Periodontology*, 70(7), 711–723.
- GENCO, R. J., HO, A. W., KOPMAN, J., GROSSI, S. G., DUNFORD, R. G., & TEDESCO, L. A. (1998). Models to evaluate the role of stress in periodontal disease. *Annals of Periodontology*, 3(1), 288–302.
- GRAZIANI, F., KARAPETSA, D., ALONSO, B., & HERRERA, D. (2017). Nonsurgical and surgical treatment of periodontitis: how many options for one disease? *Periodontology 2000*, 75(1), 152–188.
- HAJISHENGALLIS, G. (2014). Immunomicrobial pathogenesis of periodontitis: keystones, pathobionts, and host response. *Trends in Immunology*, 35(1), 3–11.
- HERRERA, D., ALONSO, B., LEÓN, R., ROLDÁN, S., & SANZ, M. (2008). Antimicrobial therapy in periodontitis: the use of systemic antimicrobials against the subgingival biofilm. *Journal of Clinical Periodontology*, 35((Suppl. B)), 45–66.
- HERRERA, D., SANZ, M., JEPSEN, S., NEEDLEMAN, I., & ROLDÁN, S. (2002). A systematic review on the effect of systemic antimicrobials as an adjunct to scaling and root planing in periodontitis patients. *Journal of Clinical Periodontology*, 29 Suppl 3, 136–59– discussion 160–2.

- JOHANNSEN, A., RYLANDER, G., SÖDER, B., & MARIE, Å. (2006). Dental Plaque, Gingival Inflammation, and Elevated Levels of Interleukin-6 and Cortisol in Gingival Crevicular Fluid From Women With Stress-Related Depression and Exhaustion. *Journal of Periodontology*, 77(8), 1403–1409.
- KINANE, D. F., RIGGIO, M. P., WALKER, K. F., MACKENZIE, D., & SHEARER, B. (2005). Bacteraemia following periodontal procedures. *Journal of Clinical Periodontology*, 32(7), 708–713.
- KNOWLES, J. W., BURGETT, F. G., NISSE, R. R., SHICK, R. A., MORRISON, E. C., & RAMFJORD, S. P. (1979). Results of periodontal treatment related to pocket depth and attachment level. Eight years. *Journal of Periodontology*, 50(5), 225–233.
- KORNMAN, K. S. (2008). Mapping the Pathogenesis of Periodontitis: A New Look. *Journal of Periodontology*, 79(8s), 1560–1568.
- LOCKHART, P. B., BRENNAN, M. T., SASSER, H. C., FOX, P. C., PASTER, B. J., & BAHRANI-MOUGEOT, F. K. (2008). Bacteremia Associated With Toothbrushing and Dental Extraction. *Circulation*, 117(24), 3118–3125.
- MARIN, M. J., FIGUERO, E., GONZALEZ, I., O CONNOR, A., DIZ, P., ALVAREZ, M., ET AL. (2016). Comparison of the detection of periodontal pathogens in bacteraemia after tooth brushing by culture and molecular techniques. *Medicina Oral Patología Oral Y Cirugía Bucal*, e276–e284.
- MENDES, D. C., SILVA, T. F., BARROS, L. DE O., DE OLIVEIRA, M. V. M., VIEIRA, L. T., HAIKAL, D. S., ET AL. (2013). Analysis of the normative conditions of oral health, depression and serotonin-transporter-linked promoter region polymorphisms in an elderly population. *Geriatrics & Gerontology International*, 13(1), 98–106.
- MOSS, M. E., BECK, J. D., KAPLAN, B. H., OFFENBACHER, S., WEINTRAUB, J. A., KOCH, G. G., ET AL. (1996). Exploratory case-control analysis of psychosocial factors and adult periodontitis. *Journal of Periodontology*, 67(10 Suppl), 1060–1069.
- NG, S. K. S., & KEUNG LEUNG, W. (2006). A community study on the relationship between stress, coping, affective dispositions and periodontal attachment loss. *Community Dentistry and Oral Epidemiology*, 34(4), 252–266.

- PAGE, R. C., & KORNMAN, K. S. (1997). The pathogenesis of human periodontitis: an introduction. *Periodontology 2000*, 14, 9–11.
- PAPAPANOU, P. N. (2015). Systemic effects of periodontitis: lessons learned from research on atherosclerotic vascular disease and adverse pregnancy outcomes. *International Dental Journal*, 65(6), 283–291.
- PAPAPANOU, P. N., SANZ, M., BUDUNELI, N., DIETRICH, T., FERES, M., FINE, D. H., ET AL. (2018). Periodontitis: Consensus report of workgroup 2 of the 2017 World Workshop on the Classification of Periodontal and Peri-Implant Diseases and Conditions. *Journal of Periodontology*, 89(Suppl 1), S173–S182.
- PASTER, B. J., BOCHES, S. K., GALVIN, J. L., ERICSON, R. E., LAU, C. N., LEVANOS, V. A., ET AL. (2001). Bacterial Diversity in Human Subgingival Plaque. *Journal of Bacteriology*, 183(12), 3770–3783.
- PERUZZO, D. C., BENATTI, B. B., AMBROSANO, G. M. B., NOGUEIRA-FILHO, G. R., SALLUM, E. A., CASATI, M. Z., & NOCITI, F. H., JR. (2007). A Systematic Review of Stress and Psychological Factors as Possible Risk Factors for Periodontal Disease. *Journal of Periodontology*, 78(8), 1491–1504.
- QUIRYNEN, M., SOERS, C., DESNYDER, M., DEKEYSER, C., PAUWELS, M., & VAN STEENBERGHE, D. (2005). A 0.05% cetyl pyridinium chloride/0.05% chlorhexidine mouth rinse during maintenance phase after initial periodontal therapy. *Journal of Clinical Periodontology*, 32(4), 390–400.
- RAMFJORD, S. P., KNOWLES, J. W., NISSLE, R. R., BURGETT, F. G., & SHICK, R. A. (1975). Results following three modalities of periodontal therapy. *Journal of Periodontology*, 46(9), 522–526.
- RAMFJORD, S. P., KNOWLES, J. W., NISSLE, R. R., SHICK, R. A., & BURGETT, F. G. (1973). Longitudinal study of periodontal therapy. *Journal of Periodontology*, 44(2), 66–77.
- RIDKER, P. M., CUSHMAN, M., STAMPFER, M. J., TRACY, R. P., & HENNEKENS, C. H. (1997). Inflammation, aspirin, and the risk of cardiovascular disease in apparently healthy men. *The New England Journal of Medicine*, 336(14), 973–979.

- ROSANIA, A. E., LOW, K. G., MCCORMICK, C. M., & ROSANIA, D. A. (2009). Stress, Depression, Cortisol, and Periodontal Disease. *Journal of Periodontology*, 80(2), 260–266.
- SANZ, M., VAN WINKELHOFF, A. J., on Behalf of Working Group 1 of the Seventh European Workshop on Periodontology. (2011). Periodontal infections: understanding the complexity - Consensus of the Seventh European Workshop on Periodontology. *Journal of Clinical Periodontology*, 38(Suppl. 1), 3–6.
- SANZ-ALONSO, M., & HERRERA-GONZÁLEZ, D. (2001). Asociación entre enfermedades periodontales y enfermedades sistémicas ¿existe la Medicina Periodontal? *RCOE*, 6(6), 659–668.
- SOCRANSKY, S. S., HAFFAJEE, A. D., CUGINI, M. A., SMITH, C., & KENT, R. L. (1998). Microbial complexes in subgingival plaque. *Journal of Clinical Periodontology*, 25(2), 134–144.
- SOLIS, A. C. O., LOTUFO, R. F. M., PANNUTI, C. M., BRUNHEIRO, E. C., MARQUES, A. H., & LOTUFO-NETO, F. (2004). Association of periodontal disease to anxiety and depression symptoms, and psychosocial stress factors. *Journal of Clinical Periodontology*, 31(8), 633–638.
- TORUMTAY, G., KIRZIOĞLU, F. Y., ÖZTÜRK TONGUÇ, M., KALE, B., CALAPOĞLU, M., & ORHAN, H. (2015). Effects of periodontal treatment on inflammation and oxidative stress markers in patients with metabolic syndrome. *Journal of Periodontal Research*, 51(4), 489–498.
- VAN DYKE, T. E., & VAN WINKELHOFF, A. J. (2013). Infection and inflammatory mechanisms. *Journal of Clinical Periodontology*, 40 Suppl 14(Suppl 6), S1–7.
- VIRTO, L., CANO, P., JIMÉNEZ-ORTEGA, V., FERNÁNDEZ-MATEOS, P., GONZÁLEZ, J., ESQUIFINO, A. I., & SANZ, M. (2017). Obesity and Periodontitis. An Experimental Study to Evaluate the Periodontal and Systemic Effects of the Co-Morbidity. *Journal of Periodontology*, 38, 1–15.
- WARREN, K. R., POSTOLACHE, T. T., GROER, M. E., PINJARI, O., KELLY, D. L., & REYNOLDS, M. A. (2014). Role of chronic stress and depression in periodontal diseases. *Periodontology 2000*, 64(1), 127–138.

